

อภิปรายผลการทดลอง

การศึกษาเปรียบเทียบสภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมการย่อยสลายไขมันของไลเปสที่สังเคราะห์จากแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงจำนวน 4 ไอโซเลท คือ ไอโซเลท PTL36, PTL38, PTL41 และ PTL44 ผลการทดลองพบว่าพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมไลเปสที่สังเคราะห์จากแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงทั้งสี่ไอโซเลท อยู่ในช่วงพีเอชที่เป็นกรดและอุณหภูมิสูงคือ 5.6-6.5 และ 50-60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ มีความคงตัวในช่วงพีเอช 6.0-7.0 และมีความคงตัวอยู่ในช่วงอุณหภูมิสูงที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เอนไซม์ยังคงมีกิจกรรมคงเหลือเท่ากับ 55.32-93.12 เปอร์เซ็นต์ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง แบคทีเรียไอโซเลท PTL38 เป็นแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูง (thermophilic bacteria) ที่สามารถสังเคราะห์ไลเปส (lipase-producing bacteria) ที่มีกิจกรรมไลเปสและความคงทนต่อช่วงสภาวะที่เป็นกรดและอุณหภูมิสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับระหว่างสี่ไอโซเลท และช่วงพีเอชและอุณหภูมิดังกล่าวตรงกับลักษณะทางกายภาพของน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมที่มีการปนเปื้อนไขมันสูงคือ มีระดับพีเอชต่ำและอุณหภูมิสูง ผลการทดลองชี้ให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการนำแบคทีเรียและ/หรือไลเปสจากแบคทีเรียนี้ไปประยุกต์ใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบกับรายงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าไลเปสจากจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีสภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมไลเปสแตกต่างกันคือ ไลเปสที่สังเคราะห์จากแบคทีเรีย T63 มีกิจกรรมสูงสุดที่อุณหภูมิ 60-70 องศาเซลเซียส และพีเอช 6.0 เมื่อเก็บไว้ที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำให้กิจกรรมไลเปสลดลงมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ (ภาวิณี, 2541) สภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมไลเปสที่สังเคราะห์จาก *Bacillus* sp. PS15 คือ พีเอชเท่ากับ 9.5 และอุณหภูมิเท่ากับ 55 องศาเซลเซียส และมีความคงตัวสูงในช่วงพีเอช 9.0-9.5 เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เอนไซม์มีกิจกรรมคงเหลือมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ และกิจกรรมไลเปสจะลดลงเหลือเพียง 31 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที (จूरिरदन, 2541) Lee Dong-Woo และคณะ (1994) รายงานว่าไลเปสที่ชอบร้อน (thermophilic lipase) จากสังเคราะห์จากแบคทีเรีย *Bacillus thermoleovorans* ID-1 มีกิจกรรมที่เหมาะสมอยู่ที่อุณหภูมิ 0-75 องศาเซลเซียส พีเอช 7.5 และยังมีกิจกรรมเหลือถึง 50 เปอร์เซ็นต์ หลังการบ่มที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และบ่มที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที Kulkarni และ Gradre (2002) รายงานว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมไลเปสที่สังเคราะห์จาก *Pseudomonas fluorescens* NS2W คือ พีเอช 9.0 และยังคงมีกิจกรรมมากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ เมื่อบ่มในช่วงพีเอช 3.0-11.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ไลเปสมีกิจกรรมสูงสุดที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และทนต่ออุณหภูมิ 30-60 องศาเซลเซียส โดยมีกิจกรรมมากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ ได้อย่างน้อย 2 ชั่วโมง

สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปสโดยแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูง ไอโซเลท PTL38 คือ พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 เพาะด้วยหัวเชื้อตั้งต้นที่มีอายุ 36 ชั่วโมง ด้วยปริมาณ 5.0 เปอร์เซ็นต์ (v/v) บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 36 ชั่วโมง โดยเชื้อสามารถสังเคราะห์ไลเปสที่มีกิจกรรมสูงสุดเท่ากับ 36.50 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตรเมื่อใช้น้ำมันปาล์ม (น้ำมันประกอบ

อาหารที่ผลิตเชิงพาณิชย์) เป็นแหล่งคาร์บอนทดแทนน้ำมันมะกอก (เกรตเออาร์) จึงเป็นการนำวัสดุเหลือทิ้งมาใช้ประโยชน์และช่วยลดต้นทุนการผลิตอีกด้วย ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Haba และคณะ (2000) กล่าวว่าเมื่อเลี้ยงแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. 3AT และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 111 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันประกอบอาหารที่ใช้แล้วเป็นสับสเตรท แบคทีเรียจะให้กิจกรรมไลเปสสูงสุดเมื่อใช้อัตราส่วนของน้ำมันมะกอกและน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวันเท่ากับ 1:1 Lee Dong-Woo และคณะ (1994) พบว่าเชื้อ *Bacillus thermoleovorans* ID-1 สามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันมะกอก น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันมินเนอร์อล ไตรกลีเซอไรด์ Tween 20 และ Tween 80 เป็นองค์ประกอบ สุวรรณ และคณะ (2540) รายงานว่าเชื้อสายพันธุ์ 1A₄₂ ให้กิจกรรมไลเปสสูงสุดเมื่อเลี้ยงใน 2% sucrose, 0.15% yeast extract, 0.09% K₂HPO₄, 0.06% KH₂PO₄, 0.02% MgSO₄·7H₂O, 0.5% CaCO₃, พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบในการเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่วนสายพันธุ์ 2C₈ จะให้กิจกรรมไลเปสสูงสุดเมื่อเลี้ยงใน 2% dextrose, 0.15% beef extract, 0.09% K₂HPO₄, 0.06% KH₂PO₄, 0.02% MgSO₄·7H₂O, 0.5% CaCO₃, พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 บ่มที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบในการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จุริรัตน์ (2541) ผลการศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญและการผลิตไลเปสโดย *Bacillus* sp. PS15 ในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งมี K₂HPO₄ 0.18 เปอร์เซ็นต์ MgSO₄ 7H₂O 0.03 เปอร์เซ็นต์ และกัมมอราบิค 0.10 เปอร์เซ็นต์ พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง Emanuilova และคณะ (1993) รายงานว่าแบคทีเรีย *Bacillus* sp. MC7 มีกิจกรรมไลเปสสูงสุด 2.0-3.0 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี Tween-80 เป็นองค์ประกอบ ส่วนแบคทีเรีย *Bacillus thermoleovorans* IHI-91 ที่แยกจากน้ำพุร้อน สามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกรดปาล์มิติก (palmitic acid) กรดสเตียริก (stearic acid) ลาโนริน (lanolin) น้ำมันมะกอก น้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน น้ำมันถั่วเหลือง และน้ำมันปลา เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน โดยไม่ต้องการเติมสารจำเป็นต่อการเจริญ (growth factor) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Markossian และคณะ, 2000) Kulkarni และ Gradre (2002) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไลเปสจากเชื้อ *Pseudomonas fluorescens* NS2W พบว่าแบคทีเรียสามารถใช้ไขมันพืชเป็นสับสเตรทได้ดีกว่าน้ำตาลเฮกโซส และน้ำตาลเพนโตส แบคทีเรียใช้น้ำตาลโมลกุลคู่และโพลีแซ็กคาไรด์ได้น้อยที่สุด

การศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันมะกอกโดยแบคทีเรียตรึงรูบบนเปลือกไข่ เอ็กซ์ตราเซลลูลาไลเปสตรึงรูบบนเปลือกไข่ และอินตราเซลลูลาไลเปสตรึงรูบบนเปลือกไข่ พบว่าสามารถย่อยสลายและลดปริมาณน้ำมันมะกอกเหลืออยู่เท่ากับ 43.03, 30.74, และ 19.66 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 120 ชั่วโมงและพบว่าวัสดุดูดซับหรือเปลือกไข่ เอ็กซ์ตราเซลลูลาไลเปสตรึงรูป และอินตราเซลลูลาไลเปสตรึงรูป สามารถลดค่า BOD ในน้ำเสียสังเคราะห์ได้เท่ากับ 62.63, 36.42 และ 48.84 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และลดปริมาณน้ำมันและไขมันเหลืออยู่เท่ากับ 31.62, 15.00 และ 29.94 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ วัสดุดูดซับหรือเปลือกไข่ เอ็กซ์ตราเซลลูลาไลเปสตรึงรูป และอินตราเซลลูลาไลเปสตรึงรูป สามารถลดค่า BOD ในน้ำเสียปนเปื้อนไขมันจากโรงงานผลิตเนื้อสัตว์เทศบาลวารินชำราบเท่ากับ 39.71, 36.72 และ 39.06 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และลด

ปริมาณน้ำมันและไขมันเหลืออยู่เท่ากับ 54.14, 32.64 และ 48.55 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ภายในเวลา 120 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเซลล์แบคทีเรียและไลเปสที่ได้จากการสังเคราะห์แบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูง ไอโซเลท PTL38 รวมทั้งอินทราเซลล์ไลเปสที่ตรึงรูอยู่บนเปลือกไข่ สามารถนำมาใช้ในการบำบัดน้ำมันและไขมันในน้ำเสียจากโรงงานผลิตเนื้อสัตว์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของ Vemuri และคณะ (1998) ซึ่งนำเปลือกไข่และอัลจิเนทมาใช้เป็นวัสดุในการตรึงไลเปส พบว่าความเร็วในการเกิดปฏิกิริยาของไลเปสอิสระ ไลเปสที่ตรึงรูบนเปลือกไข่และไลเปสที่ถูกห่อหุ้มด้วยอัลจิเนท มีค่าเท่ากับ 53.779 IU, 37.450 IU, 31.543 IU ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าไลเปสที่ตรึงรูบนเปลือกไข่ สามารถนำมาใช้ซ้ำได้แปดครั้ง ในขณะที่นำไลเปสที่ถูกห่อหุ้มด้วยอัลจิเนทมาใช้ซ้ำได้เพียงสี่ครั้ง นอกจากนี้นักวิจัยคณะอื่นๆ ได้ทำการทดลองในทำนองเดียวกันด้วยจุลินทรีย์หลากหลายชนิด ตัวอย่างเช่น เชื้อแบคทีเรีย *Geotrichum candidum* มีประสิทธิภาพในการย่อยไขมันสูงสุดภายในเวลา 36 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และสามารถลดค่า BOD ในน้ำเสียสังเคราะห์ได้ 64.82 เปอร์เซ็นต์ และมีไขมันเหลืออยู่ 43.3 เปอร์เซ็นต์ (เกศสุนทร, 2538) พิชญ์นาฏ (2546) พบว่าการทดลองชุดที่มีการเติมแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ ไอโซเลท L1, L2 และ L3 สามารถลดปริมาณน้ำมันถั่วเหลือง ค่าซีไอดี และค่าบีไอดี ได้เท่ากับ 97.5, 86.3 และ 87.8 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ชุดที่มีการเติมแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ ไอโซเลท L1, L2, L3, ร่วมกับ *Acinetobacter* sp. และ *Yarrowia* sp. สามารถลดปริมาณน้ำมันถั่วเหลือง ค่าซีไอดี และค่าบีไอดี ได้เท่ากับ 97.5, 86.5 และ 87.6 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ Okuda Shin-ichi และคณะ (1991) รายงานว่าจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยไขมันวัว น้ำมันหมู น้ำมันมะกอก และน้ำมันสลัดที่ใช้แล้วได้ดี คือ แบคทีเรีย *Bacillus* sp. และเมื่อนำแบคทีเรียนี้มาทดสอบการบำบัดน้ำเสียด้วยระบบการไหลย้อนกลับของน้ำเสีย (water circular system) พบว่าไขมันถูกกำจัดได้เกือบสมบูรณ์ โดยไม่ต้องผ่านการบำบัดทางกายภาพ Dharmsthiti และ Luchai (1998) นำไลเปสที่ผลิตโดย *Aeromonas sobria* LP094 มาตรึงแบบ อีออน (ionic binding) ด้วย IR20 และ IRC50 พบว่าไลเปสตรึงรูยังคงมีกิจกรรมมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ หลังจากเก็บที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) หรือที่ 4 องศาเซลเซียส และหลังจากการใช้ซ้ำห้าครั้ง ไลเปสตรึงรูทั้งสองชนิดยังคงมีกิจกรรมมากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ Becker และคณะ (1999) ศึกษาการย่อยสลายน้ำมันมะกอกและการบำบัดน้ำเสียที่มีไขมันสูงจากโรงงานฟอกขนสัตว์ภายใต้การให้อากาศ ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส โดยใช้แบคทีเรีย *Bacillus thermoleovorans* IHI-91 พบว่าการเจริญของแบคทีเรียจะถูกยับยั้งเมื่อความเข้มข้นของน้ำมันมะกอกเพิ่มขึ้นมากกว่า 4 g COD/L การบำบัดไขมันในน้ำเสียที่มีค่า COD เท่ากับ 77,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ไขมันมีความเข้มข้น 17,000 มิลลิกรัมต่อลิตร เกิดขึ้น 20-30 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 10-20 ชั่วโมง ในขณะที่ค่า COD ลดลง 15-20 เปอร์เซ็นต์ bMongkolthanasuk และ Saovane (2002) นำเชื้อผสมระหว่าง *Pseudomonas aeruginosa* LP602, *Bacillus* sp. B304 และ *Acinetobacter calcoaceticus* LP009 มาใช้ในการบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนไขมัน พบว่าค่า BOD (3,500 มิลลิกรัมต่อลิตร) และปริมาณไขมัน (20,000 มิลลิกรัมต่อลิตร) ลดลงเหลือน้อยกว่า 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายใน 12 วัน ภายใต้สภาวะมือออกซิเจน Leal และคณะ (2002) นำสารสกัดที่มีกิจกรรมไลเปสสูงที่ได้จากการผลิตของ *Penicillium restitum* โดยการหมักบนอาหารแบบแข็ง (solid state fermentation) มาใช้ในการบำบัดน้ำเสียที่มีไขมันสูงจากโรงงานผลิตภัณฑ์

นม โดยนำน้ำเสียมาผ่านการย่อยสลายด้วยสารสกัดไลเปส (10% v/v) ที่มีกิจกรรมเท่ากับ 2.1 ยูนิต์ต่อ มิลลิลิตร เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส โดยไม่มีการเขย่า จากนั้นนำน้ำเสียที่ผ่านการย่อยสลายและไม่ผ่านการย่อยสลายด้วยไลเปสเข้าสู่การบำบัดทางชีวภาพแบบไม่ให้อากาศในฟลาสก์ขนาด 120 มล. ที่ปิดสนิท พบว่าน้ำเสียที่ผ่านการย่อยสลายด้วยไลเปสมีค่า COD ลดลง 80-95 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่น้ำเสียที่ไม่ผ่านการย่อยสลายด้วยไลเปสมีค่า COD ลดลง 19-55 เปอร์เซ็นต์ เมื่อน้ำเสียมีความเข้มข้นของไขมันและน้ำมันในระดับต่างๆ Jeganathan และคณะ (2006) นำไลเปสที่ผลิตจาก *Candida rugosa* มาตรึงในรูปแบบของเม็ดบีดแคลเซียมอัลจิเนท และนำไปศึกษาการย่อยสลายไขมันและน้ำมันในน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมผลิตอาหารสัตว์เลี้ยง ผลการทดลองพบว่าปริมาณ ไขมันและน้ำมันถูกย่อยสลายไป 50 เปอร์เซ็นต์ หลังการบำบัดสามวัน และพบว่า 65 เปอร์เซ็นต์ของเม็ดบีดแคลเซียมอัลจิเนท ยังคงมีกิจกรรมไลเปสเหลืออยู่ประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์

การตรวจวินิจฉัยเพื่อจำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยวิธี 16S rRNA analysis พบว่าลำดับเบสของเชื้อแบคทีเรียขอบอุณหภูมิสูงที่สังเคราะห์ไลเปสไอโซเลท PTL38 สอดคล้อง 96 เปอร์เซ็นต์ กับลำดับเบสของ *Geobacillus stearothermophilus* 16S rRNA gene (Accession no. [EU652090.1](#)) ดังนั้นแบคทีเรียขอบอุณหภูมิสูงที่สังเคราะห์ไลเปสไอโซเลท PTL38 คือ *Geobacillus stearothermophilus* PTL38

